

XP-002202239

AN - 1995-019136 [03]

AP - JP19930099775 19930426

CPY - KAWA-I

DC - A96 D22

FS - CPI

IC - A01N1/02

MC - A10-E A10-E08C A12-V03C2 A12-W11L D09-A01

PA - (KAWA-I) KAWAMURA A

PN - JP6305901 A 19941101 DW199503 A01N1/02 009pp

PR - JP19930099775 19930426

XA - C1995-008641

XIC - A01N-001/02

AB - J06305901 A perfusate consists of 0.1-10 (W/V)% of perfluorocarbon cpd., 1-20 mmol/L of glucose, 10-200 U/L of insulin, 0.1-5 mmol/L of allopurinol, 1-10 mg/L of SOD (superoxide dismutase) reacted with PED (polyethylene glycol), 1-10 mmol/L of adenosine, 1-20 mg/L of dexamethasone, 1-5 (W/V)% of hydroxyethyl starch, 140-145 mEq/L of sodium ions, 2-6 mEq/L of potassium ions, and 90-95 mEq/L of salt ions; and its pH is 7-8, and the osmotic pressure is 300 to 340 mOsm/L.

- USE/ADVANTAGE - The perfusate is used to reserve transplantation organs under room temp. In storing the transplantation organs under room temperature, pref., the perfusate is subjected to oxygenation, and is supplied to the organs at a perfusion pressure of 60-100 mm Hg. Stable perfusion pressure can be maintained and sufficient oxygen can be supplied. Thus, transplantation organs can be stored at room temperature (10-30 deg.C) for a long period of time (1-20 hours).(Dwg.0/1)

IW - PERFUSION STORAGE ROOM TEMPERATURE CONSIST PER FLUORO CARBON COMPOU
GLUCOSE INSULIN ALLOPURINOL DISMUTASE REACT POLYETHYLENE GLYCOL
RESERVE TRANSPLANT ORGAN

IKW - PERFUSION STORAGE ROOM TEMPERATURE CONSIST PER FLUORO CARBON COMPOU
GLUCOSE INSULIN ALLOPURINOL DISMUTASE REACT POLYETHYLENE GLYCOL
RESERVE TRANSPLANT ORGAN

NC - 001

OPD - 1993-04-26

ORD - 1994-11-01

PAW - (KAWA-I) KAWAMURA A

TI - Perfusate for storing under room temp. - consists of per:fluoro-carbon cpd., glucose, insulin, allopurinol, superoxide dismutase reacted with polyethylene glycol, etc., used to reserve transplantation organs

A01 - [001] 017 ; R00351 G1558 D01 D23 D22 D31 D42 D50 D82 F47 ; P0975
P0964 F34 D01 D10 ; P0055 ; H0000 ; M9999 M2153-R ; M9999 M2200 ;
M9999 M2835 ;

- [002] 017 ; R01863-R D01 D11 D10 D23 D22 D31 D42 D50 D86 F24 F29 F26
F34 H0293 P0599 G3623 ; M9999 M2200 ;

- [003] 017 ; ND01 ; Q9999 Q8059 Q7987 ; Q9999 Q8082 ; K9370 ;

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-305901

(43) 公開日 平成6年(1994)11月1日

(51) Int.Cl.³

A 0 1 N 1/02

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

9159-4H

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号

特願平5-99775

(22) 出願日

平成5年(1993)4月26日

(71) 出願人 593081431

川村 明夫

北海道札幌市豊平区月寒西二条10丁目2番
75号

(72) 発明者 川村 明夫

北海道札幌市豊平区月寒西二条10丁目2番
75号

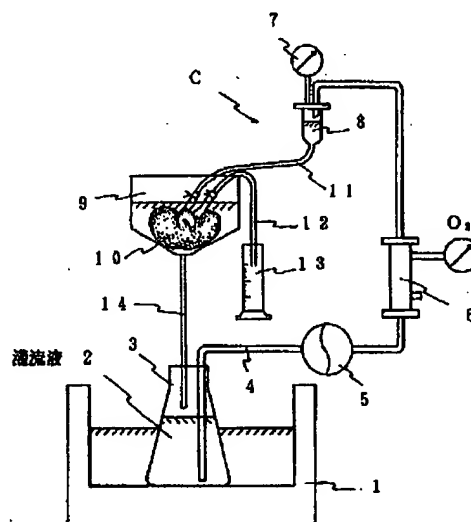
(74) 代理人 弁理士 高島 一

(54) 【発明の名称】 室温下保存用灌流液およびこれを用いた保存方法

(57) 【要約】

【構成】 パーフルオロカーボン化合物0.1～10 (w/v)%, グルコース1～20 mmol/L、インシュリン10～200 U/L、アロプリノール0.1～5 mmol/L、PEG化SOD1～10 mg/L、アデノシン1～10 mmol/L、デキサメタゾン1～20 mg/L、ヒドロキシエチル澱粉1～5 (w/v)%, ナトリウムイオン140～145 mEq/L、カリウムイオン2～6 mEq/L および塩化物イオン90～95 mEq/L を加え、そのpHを7～8、浸透圧を300～340 mOsm/Lに調製して、灌流液2とする。

【効果】 灌流液2を酸素化した後、灌流圧60～100 mmHgにて移植臓器10等を灌流することによって、代謝を維持するために充分な酸素を供給できるため、室温下で長時間にわたり移植臓器10等を保存・灌流することができる。したがって、低温下保存による移植臓器10等への障害がない。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 パーフルオロカーボン化合物0.1～10 (w/v)%, グルコース1～20 mmol/L、インシュリン10～200 U/L、アロプリノール0.1～5 mmol/L、PEG化SOD1～10 mg/L、アデノシン1～10 mmol/L、デキサメタゾン1～20 mg/L、ヒドロキシエチル澱粉1～5 (w/v)%, ナトリウムイオン140～145 mEq/L、カリウムイオン2～6 mEq/L および塩化物イオン90～95 mEq/L の組成からなる灌流液であって、そのpHが7～8、浸透圧が300～340 mOsm/Lであることを特徴とする室温下保存用灌流液。

【請求項2】 請求項1記載の灌流液を酸素化し、臓器に灌流圧60～100 mmHgで灌流することを特徴とする臓器の室温下保存方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、移植臓器等を室温下にて保存するのに有用な灌流液、およびこの灌流液を用いて移植臓器等を室温下にて保存する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年において臓器移植に際しての臓器の保存技術の進展はめざましく、保存技術の進歩は、例えば腎臓移植の普及をますます促進している。臨床的に採用されている臓器保存法には、低温単純浸漬法 [Lancet, 2, 1219-1222 (1969)] および低温灌流法 [Lancet, 2, 536 (1967)] がある。これらの方法は、通常0～10℃の低温下での保存により移植臓器の代謝を抑制させて、長時間の保存を可能とする。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、低温下保存時に移植臓器の代謝を一旦抑制させるため、移植時に保存臓器の（代謝）機能が再現できるかどうか問題があり、その評価方法も確立されていない。また、低温下保存による移植臓器への障害も検討を要するとされている。

【0004】 そこで、移植臓器の代謝を行わせつつ保存する方法として、室温下での保存・灌流方法が検討されている。例えば、第28回日本人工臓器学会大会予稿集, No.192, p120 (1990年9月) に記載されている方法では、酸素および基質の供給が適正になされれば長時間の保存が可能となるものと期待される。

【0005】 また、パーフルオロカーボンを用いた室温下での腎臓あるいは肝臓の保存方法は既に各種報告されている (特開昭55-51016号公報, Proceedings of the Xth international congress for nutrition: Symposium on perfluorochemical artificial blood, Kyoto 1975, 187-201, Nihon Gekagakukai Zasshi (J. Jap. Surg. Soc.), 74(5), 397 [1973]等)。

【0006】 そこで本発明の目的は、従来のものよりもさらに優れた臓器保存作用を有し、室温下で代謝を維持しながら移植臓器等を保存することができる灌流液、お

および室温下での臓器等の保存方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、上記目的を達成すべく研究を重ねた結果、パーフルオロカーボン化合物を基本要素とし、下記の特定制成（細胞外液の組成を有する）からなる灌流液が優れた臓器保存作用を有すること、およびこの灌流液を用いて室温下で臓器を保存する方法を見出して本発明を完成した。

【0008】 即ち本発明は、パーフルオロカーボン (PFC) 化合物0.1～10 (w/v)%, グルコース1～20 mmol/L、インシュリン10～200 U/L、アロプリノール0.1～5 mmol/L、PEG化SOD1～10 mg/L、アデノシン1～10 mmol/L、デキサメタゾン1～20 mg/L、ヒドロキシエチル澱粉 (HES) 1～5 (w/v)%, ナトリウムイオン140～145 mEq/L、カリウムイオン2～6 mEq/L および塩化物イオン90～95 mEq/L の組成からなる灌流液であって、そのpHが7～8、浸透圧が300～340 mOsm/Lである室温下保存用灌流液に関する。

【0009】 また、当該室温下保存用灌流液を酸素化し、灌流圧60～100 mmHgで灌流することを特徴とする臓器の室温下保存方法に関する。

【0010】 本発明で用いられるパーフルオロカーボン化合物は、化学的に不活性で、酸素溶解性に優れ、室温で液状のものであれば特に限定されない。かかるパーフルオロカーボン化合物の好適な例としては、炭素数9～12のパーフルオロ炭化水素、炭素数9～12のパーフルオロ第三級アミン等が挙げられる。

【0011】 パーフルオロカーボン化合物の具体例としては、例えばパーフルオロシクロアルカン、パーフルオロアルキルシクロアルカン、パーフルオロシクロヘキサン、パーフルオロデカリン、パーフルオロアルキルデカリン、パーフルオロアルキルテトラハイドロピラン、パーフルオロアルキルテトラハイドロフラン、パーフルオロアルカン、パーフルオロターシャリーアルキルアミン、パーフルオロー-N、N-ジアルキルシクロヘキシルアミン、パーフルオロアルキルピペリジン、パーフルオロアルキルモルホリン、パーフルオロアダマンタン、パーフルオロアルキルアダマンタン等 (特開昭50-69219号公報参照) が挙げられる。また、パーフルオロー-N-メチルパーヒドロキノリン、パーフルオロー-N-メチルデカハイドロイソキノリン、パーフルオロー-4-メチルオクタハイドロキノリジン、パーフルオロー-3-メチルオクタハイドロキノリジン、パーフルオロー-2-メチルオクタハイドロキノリジン、パーフルオロー-1-メチルオクタハイドロキノリジン、パーフルオロー-9a-メチルオクタハイドロキノリジン、パーフルオロー-4-エチルオクタハイドロキノリジン等も好ましいパーフルオロカーボン化合物として例示される。

【0012】パーフルオロカーボン化合物の濃度は、当該灌流液中0.1~10(w/v)%であり、より好適には1~5(w/v)%である。

【0013】本発明にて使用されるパーフルオロカーボン化合物の酸素溶解性は、一般に液温36℃において40~60(v/v)%、好ましくは45~55(v/v)%である。

【0014】当該パーフルオロカーボン化合物は、灌流液の酸素運搬を目的として用いられ、酸素を高濃度に含有する状態で臓器保存用に供される。従って、パーフルオロカーボン化合物は予め高濃度に酸素を溶解させておくか、より好ましくは使用時に酸素を溶解させながら使用に供される。

【0015】本発明において、パーフルオロカーボン化合物は乳剤の形態で使用され、好適にはパーフルオロカーボン化合物が水中に分散した水中油型乳剤である。

【0016】乳化剤としては高分子系非イオン性界面活性剤、リン脂質等が用いられる。高分子系非イオン系界面活性剤としては分子量2,000~20,000のものが好適であり、例えばポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマー、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体等が挙げられる。また、リン脂質としては卵黄リン脂質、大豆リン脂質等が挙げられる。乳化剤は、当該灌流液中1~5(w/v)%となるように添加される。

【0017】さらに所望により、炭素数8~22(好ましくは炭素数14~20)の脂肪酸、またはこれらの生理的に受け入れられる塩(例：アルカリ金属塩(ナトリウム塩、カリウム塩等)、モノグリセリド等)等を乳化補助剤として加えることができる。具体的には、例えばカプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、ペヘン酸、パルミトリン酸、オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸、あるいはそれらのナトリウムまたはカリウム塩、もしくはそれらのモノグリセリド等が挙げられる。乳化補助剤は、当該灌流液中0.001~0.1(w/v)%となるように添加される。

【0018】さらにグリセロールの如き等張化剤の使用は結果として不要である。

【0019】乳剤の調製は従来公知の方法で行えばよく、例えば特開昭52-96722号公報、特開昭58-225013号公報等に記載の方法等が例示される。

【0020】当該乳剤は各成分を任意の順序に混合して粗乳化し、適当な乳化機(例えば、マントンゴーリン型乳化機)によって粒子径が0.3μm以下となるように均質化することによって調製される。

【0021】本発明の室温下保存用灌流液において、パーフルオロカーボン(乳剤)以外の組成としては、グルコース1~20mmol/L、インシュリン10~200U/L、アロプリノール0.1~5mmol/L、PEG化SOD1~10mg/L、アデノシン1~10mmol/L、デキサメタ

ゾン1~20mg/L、ヒドロキシエチル澱粉1~5(w/v)%、ナトリウムイオン140~145mEq/L、カリウムイオン2~6mEq/Lおよび塩化物イオン90~95mEq/Lである。特に好ましくは、グルコース5~15mmol/L、インシュリン20~100U/L、アロプリノール0.5~3mmol/L、PEG化SOD3~7mg/L、アデノシン3~7mmol/L、デキサメタゾン5~10mg/L、ヒドロキシエチル澱粉2~4(w/v)%、ナトリウムイオン140~145mEq/L、カリウムイオン約4mEq/Lおよび塩化物イオン約93mEq/Lである。

【0022】当該灌流液において、グルコースは組織のエネルギー源として用いられ、同時に浸透圧を維持するためにも使用される。また、これに対応したインシュリンも加える。

【0023】アロプリノールとPEG化SODは活性酸素捕捉剤として用いられる。ここでPEG化SODとは、ポリエチレングリコール(PEG)をスーパーオキシサイドジスムターゼ(SOD)に化学結合させたものである(特開昭62-115280号公報参照)。

【0024】デキサメタゾンは膜安定化剤として用いられる。

【0025】ヒドロキシエチル澱粉は分子量1万~35万程度、好ましくは20万~30万程度のものが例示される。また、置換度としては0.4~0.7程度が例示される。

【0026】上記成分以外に、障害腎がconditioningされる時の基質として、アミノ酸類を使用することもできる。さらに、緩衝液も使用することができ、具体的にはHEPES等が例示される。

【0027】本発明の灌流液は、細胞外液により近づけるためにpH7~8とし、組織の浮腫を防ぐために浸透圧300~340mOsm/Lとする。特にpH約7.4、浸透圧約320mOsm/Lであることが好ましい。

【0028】本発明の灌流液の製法は特に限定されない。上記の成分を適宜混和することにより、本発明の灌流液を調製することができる。

【0029】次に、本発明の臓器の室温下保存方法は、当該灌流液を酸素化し、灌流圧60~100mmHgで灌流することにより、移植臓器等の臓器を室温下(10~30℃、好ましくは約24℃)で保存する方法である。

【0030】灌流液の酸素化は公知の手法により行うことができる。本発明においては、バブリング法、膜型人工肺法等により酸素化を行うことが好ましい。

【0031】臓器を灌流による物理的障害から保護し、かつ十分な酸素や基質の供給を維持するためには、灌流圧を60~100mmHgにすることが必要である。灌流圧が60mmHg未満であると、灌流液の流量が不十分となり、一方、100mmHgを越えると、保存臓器の血管障害等を来すからである。

【0032】この条件により、当該灌流液は、室温下に

において酸素分圧450mmHg以上で酸素を供給することができる。

【0033】本発明の保存方法の対照となる臓器としては、臓器移植における腎臓あるいは肝臓等が例示される。

【0034】

【発明の効果】本発明の室温下保存用灌流液によれば、安定した灌流圧を維持し、充分な酸素を供給できるため、室温下(10~30℃、好ましくは約24℃)で長時間(1~20時間程度)にわたり移植臓器を保存・灌流することができる。

【0035】また、室温下で保存することにより、例えば移植臓器の代謝を抑制せずに維持することが可能になる。従って、保存臓器のviabilityを移植前に知り得るという利点を有する。即ち、保存中の臓器のviabilityを各種検査法により連続的にモニターしながら、限界までの長時間保存が可能となる。例えば、腎臓を保存する場合には、利尿の程度、尿の色調、尿pHや尿中ナトリウム、カリウム値等の簡便かつ迅速な検査法等により、保存腎臓のviabilityを判定することが可能となる。

【0036】さらに、室温下保存法を行う目的の一つに、保存臓器や障害を受けた臓器のconditioning効果がある。本発明の灌流液を用いる臓器の室温下保存方法に

よれば、温阻血または冷却による障害を受けたヒトを含む哺乳類動物の臓器を良好な状態にconditioningすることが可能となる。

【0037】

【実施例】本発明をさらに詳細に説明するために実施例および実験例を挙げるが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【0038】実施例1

ヒドロキシエチル澱粉およびアロプリノール(A液用)、グルコース、塩化ナトリウム、酪酸ナトリウムおよびリン酸二水素カリウム(B液用)を各々精製水に溶解した。A液およびB液を混合し、アデノシンを添加、溶解した。HEPES、硫酸マグネシウム、アミノ酸製剤、ホスミシンの各水溶液を添加した。水酸化ナトリウム溶液でpHを7.4に調整した。全量を合わせた後、孔径0.20μmのメンブランフィルターにて加圧濾過した。パーフルオロトリブチルアミン(商品名FC-43、ミドリ十字社製)、デキサメタゾン、インシュリンおよびPEG化SODを無菌的に添加した。最終組成は表1のようになる。

【0039】

【表1】

灌流液の組成 (細胞外液)

成 分	1 L 当りの組成
NaCl	93 mmol
乳酸ナトリウム	27 mmol
KH ₂ PO ₄	4 mmol
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3 mmol
グルコース	11 mmol
アミノ酸	0.75 g
HEPES (緩衝液)	25 mmol
アロプリノール	1 mmol
PEG-SOD	5 mg
アデノシン	5 mmol
デキサメタゾン	8 mg
インシュリン	50 U
ホスホマイシンナトリウム	0.66 mmol
ヒドロキシエチル澱粉 (HES)	30 g
FC-43	30 g

室温下でNaOHによりpH7.40に調整

最低値Na: 140~145mEq/L, K: 4mEq/L,

Cl: 93mEq/L, 浸透圧: 320mOsm/L

【0040】実験例1

実施例1の灌流液を用いて、以下に示す実験を行った。

① 実験動物と腎摘出法

実験動物は、体重2.5~3.5kgの家兎 (日本白色種・雌雄) を一定期間ケージ内で飼育した後用いた。麻酔は、耳静脈より、チアミラールナトリウム20~25mg/kgとヘパリンナトリウム100単位/kgの静注により導入し、エーテル麻酔で維持した。腹部正中切開後、尿管に外径5Frのカテーテル (テルモ社製) を挿入固定し、採尿ルートとした。次に、腎動脈および腎静脈を剥離し、腎動脈に5Frのカテーテルを挿入後、腎静脈を切断し、4℃の乳酸リンゲル液 (ヘパリン5000単位/500ml) で洗浄した。腎の重量を測定後、図1に示される灌流回路に接続した。

【0041】② 灌流回路と灌流条件

a. 灌流回路

図1において、振盪恒温槽1内には実施例1の灌流液2の入った灌流液リザーバー3が載置され、灌流液2の温度は一定に保持されている。灌流液リザーバー3中の灌流液2は、ライン4を介してローラーポンプ5によって汲み上げられ、膜型人工肺6 (HSO-03, メラシロックス-S (登録商標)、泉工医科社製) により灌流液2の酸素化が行われ、圧力計7を備えたエアートラップ8に供給される。エアートラップ8中の灌流液2は、臓器チャンバー9中の灌流液2に浸漬された摘出腎10に、腎動脈に接続された動脈ライン11を介して供給されている。供給された灌流液2の一部は、摘出腎10により濾過されて、尿としてチューブ12を介してメスシリンダー13に捕集され、残余の灌流液2は、ライン14を介して灌流液リザーバー3に回収される。

【0042】b. 酸素化法

最初は灌流液リザーバー3内に直接酸素を吹き込むバブリング法により酸素化を行い、途中からはhollow fiber型の膜型人工肺を使用する方法に変更した。バブリング法では、多孔性のチューブを灌流液リザーバー3の灌流液2中に浸漬し、酸素分圧が150mmHg以下にならぬように純酸素の流量を調節した。また、使用した膜型人工肺6は、膜面積0.3m²、priming volume 20ml、最大流量300ml/minで、内径200μm、膜厚100μmのシリコンhollow fiberを3000本束ね、ポリカーボネート樹脂で被覆したものである。酸素流量は1.0L/minとした。

【0043】c. 灌流圧と灌流方法

灌流保存における灌流による損傷を防ぎ、代謝を維持するための、必要十分な酸素や基質を供給するのに適切な灌流圧を検討する目的で、50mmHgと80mmHgの群について検討した。12時間まで灌流し、灌流液は6時間毎に交換した。

【0044】③ 実験群

実験群は温阻血時間と灌流圧により以下の6群に分けた。

I群：灌流圧50mmHg、温阻血0分群 (n=5)

II群：灌流圧80mmHg、温阻血0分群 (n=6)

III群：灌流圧80mmHg、温阻血30分群 (n=6)

動脈血流遮断後、30分間腹腔内に放置し、その後洗浄を行った。

IV群：灌流圧80mmHg、温阻血35分群 (n=8)

動脈血流遮断後、35分間腹腔内に放置し、その後洗浄を行った。

V群：灌流圧80mmHg、温阻血40分群 (n=6)

VI群：UW液内24時間冷却(4℃)保存群 (n=6)

他群と同様の操作で腎の剥離と、カニキュレーションを施行し、腎動脈血流遮断直後から4℃に冷却したUW液内に単純浸漬し、24時間の保存後に灌流圧80mmHgで、12時間まで室温下灌流を行った。I~II群は、適切な灌流圧を決定すると共に、室温下灌流保存法の可能性の検討、およびIII~VI群のコントロールとして位置付けられるものである。また、III~VI群は、機能判定およびconditioningの可能性を検討するものとして位置付けられるものである。

【0045】④ 検査項目と測定方法

1) 灌流量：流量調節機能のあるローラーポンプ5 (MP-101、東京理科学機器社製)の表示目盛による検量線グラフを作成し、流量を測定した。

2) 灌流圧：エアートラップ8に圧力計7 (最小目盛5mmHg、Aneroid Sphygmomanometer、NITIRIN社製、0~500mmHg)を設置して、連続的にモニターした。

3) 灌流液ガス分析 (pH、酸素分圧、炭酸ガス分圧)：全自動アナライザー (ABL-30、Radiometer社製)で測定した。

4) 2時間毎の尿量：容量20mlのメスシリンダー13 (Pyrex社製)を用いて測定した。

5) 尿pH、尿中電解質 (ナトリウム、カリウム値)：尿pHは全自動アナライザー (ABL-30)で、電解質は日立7150 (日立社製)で測定した。

6) 灌流前後の腎の重量変化：最小目盛1gの台式秤量計 (ヤマト社製)を用いて測定した。

7) 腎の病理組織学的検査：灌流終了時に、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および酵素組織化学染色で観察した。後者は、アルカリフォスファターゼ (A1-P)、酸フォスファターゼ (Ac-P)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、コハク酸脱水素酵素 (SDH)、γ-グルタミルトランスベプチダーゼ (γ-GTP) について検討した。

なお、数値は全て平均値±SDで表し、有意差検定は、unpaired t test (個体数が異なる2群間の有意差検定法)にて行い、危険率5%以内を有意差ありとした。

【0046】〔結果〕

I群

初期灌流量は0.91±0.01ml/min/g腎であった。しかし、経過中に回路内圧の上昇により、最終的には0.31±0.27ml/min/g腎と約1/3に低下した。腎の重量変化は、平均19.2%増加した。5例中3例は、回路内圧の上昇により、12時間までの灌流が不可能となった。一方、利尿は回路内圧の上昇を契機に出現した。しかし、全例で利尿および回路内圧の調節が不良で、実験の継続は困難であった。

【0047】II群

初期流量は1.58±0.13ml/min/g腎であり、灌流中もほぼ一定の流量を維持した。灌流液のpHは、ほぼ設定値の7.40前後を示し、利尿の程度や保存状態により多少の変化はあるものの、最低で7.33ΔpH、最高で7.47ΔpHの範囲の変動に留まった。灌流液の酸素分圧は、465.8mmHgから850.0mmHgの間で変動したが、400mmHgを下回ることにはなかった。全例で灌流開始直後より透明な尿の流出を認め、全経過を通じて一定の利尿が認められた。尿のpHは6時間後に最低値の6.55±0.14ΔpHを示したが、以後漸増した。尿中ナトリウム値は、4時間後は最低の55.0±22.9mEq/Lで、以後漸増し、12時間目では113.7±21.7mEq/Lを示した。尿中カリウム値は、最初の2時間で50.5±6.4mEq/Lと最高値を示し、以後減少して、12時間目では19.3±9.0mEq/Lとなった。摘出腎の重量は、灌流開始直後で15~19gであり、6例中3例は重量変化なく、2例で増加、1例で減少した。平均重量増加率は+8.7±11.1%であった。組織学的変化をHE染色でみると、糸球体の構築は良好に保たれ、尿細管上皮にも扁平化や脱落の所見を認めなかった。また、酵素組織化学染色では、A1-P染色で、尿細管の胞体内に酵素反応が紫赤

II

色に濃染され、良好なviabilityを示した。これは他の酵素染色でも同様の所見を認めた。以上の成績は、6例全例を総括した成績である。しかし、この6例のうち1例は他の5例と比較して尿組成の変動が大幅に異なっていた。即ち、尿中ナトリウム値は、他の5例に比して全経過を通じて明らかに低値であった。また、尿中カリウム値も同様に高値であり、この傾向は尿pHについても同様であった。

【0048】III群

初期流量は 1.69 ± 0.20 ml/min/g腎であり、灌流中もほぼ一定の流量を維持した。終了時の流量は 1.72 ± 0.1 ml/min/g腎となった。灌流液のpHは $7.31 \sim 7.40$ ΔpHの間で変動した。灌流液の酸素分圧はII群と同様に 400 mmHgを下回ることにはなかった。また、炭酸ガス分圧は、 $2.4 \sim 6.1$ mmHgの間で変動した。全例で、開始後間もなく利尿を認め、II群と同様に全経過を通じて一定の利尿を認めた。尿pHは4時間目には最低値の 6.67 ± 0.13 ΔpHに達し、以後漸増した。尿中ナトリウム値は、4時間後に最低の 50.7 ± 10.7 mEq/Lで以後漸増し、12時間目では 122.0 ± 16.9 mEq/Lとなった。尿中カリウム値も4時間に最高値の 56.0 ± 7.7 mEq/Lとなり、以後漸減した。摘出腎の重量は、灌流開始直後で $11 \sim 19$ gであり、1例が灌流前後も変化なく、4例が増加、1例が減少した。平均の重量増加率は $9.2 \pm 9.2\%$ であった。HE染色では、糸球体・尿管共にII群と同様、その構築は良好に保たれていたが、尿管胞体の扁平化がわずかに認められた。酵素組織化学染色では、A1-P染色で、尿管の胞体内の染色性はII群とほぼ同じであった。また、他の酵素染色も同様であった。

【0049】IV群

8例中2例で殆ど利尿を認めず、1例で利尿を認めたものの、尿組織が灌流液の組成とほぼ同じであったため、脱落例とし、5例について検討した。5例の初期流量は 1.85 ± 0.39 ml/min/g腎であり、全経過を通して良好な流量が得られた。灌流液のpHの12時間の変動は $7.23 \sim 7.41$ ΔpHと、II、III群に比してやや低くなる例があったが、大部分は 7.30 ΔpH以上で留まった。灌流液の酸素分圧は、 400 mmHgを下回る事はなかった。また、炭酸ガス分圧は $2.7 \sim 6.7$ mmHgと低値で経過した。5例は灌流後間もなく利尿を認めたが、流出量はII群に比較して少なくIII群とほぼ同じ傾向が認められた。尿pHは 6.88 ± 0.17 ΔpHであり、6時間まで徐々に低下し、 6.69 ± 0.14 ΔpHとなったが、以後上昇に転じ、12時間目では 6.91 ± 0.16 ΔpHであった。尿中ナトリウム値は、4時間後に最低の 76.2 ± 16.5 mEq/Lとなったが次第に増加し、12時間後は 117.0 ± 10.9 mEq/Lに達した。尿中カリウム値は最初の2時間で 42.6 ± 12.2 mEq/Lと最高値を示し、以後漸減し

12

た。摘出腎の重量は、不変が1例、増加が3例であり、減少したのは1例であった。平均の増加率は $13.2 \pm 11.3\%$ であった。III、IV群の成績ではいずれの値もII群との間に有意差はなかった。HE染色では、糸球体の構築は良好に保たれたが、III群と同様に、尿管の胞体の扁平化が軽度認められた。また、上皮の脱落は認められなかった。酵素組織化学染色では、A1-P染色で、染色性が劣ったが、完全に失われた訳ではなかった。これは他の染色法でも同様の傾向であった。

【0050】V群

6例中3例では利尿不良で尿の各種組成は灌流液の組成に近かったため、分析には利尿が良好な3例についてのみ検討した。即ち、温阻血40分では、半数の腎が不可逆的な機能不全をきたした。良好例3例と不良例3例とを、灌流量で比較すると、初期流量では良好例が 1.92 ± 0.41 ml/min/g腎であったのに対して、不良例では 1.35 ± 0.14 ml/min/g腎と明らかに低下しており、終了時の流量は、前者で 1.81 ± 0.40 ml/min/g腎、後者で 1.51 ± 0.31 ml/min/g腎であった。利尿良好例3例では、灌流開始後間もなく利尿を認め、最初の2時間では 10.4 ± 5.6 mlであり、12時間の総尿量は 50.0 ± 13.1 mlに達し、むしろ他の群より多い傾向を認めた。良好例の尿pHは、 6.95 ± 0.22 ΔpHであり、6時間までは徐々に低下し 6.88 ± 0.15 ΔpHとなったが、以後上昇し、12時間目では 7.05 ± 0.07 ΔpHと 7.00 ΔpHを越えた。これは、II群と比べて有意($P < 0.05$)に高値であった。尿中ナトリウム値は、3例のばらつきが大きく、最初の2時間で 89.7 ± 44.4 mEq/Lであった。以後、4時間後に 86.3 ± 31.5 mEq/Lとやや回復の微をみせたものの、次第に上昇し、12時間後には、灌流液のナトリウム組成に近い 130.7 ± 17.6 mEq/Lとなった。即ち、尿管の再吸収能の破綻が示唆された。尿中カリウム値は、最初の2時間で 35.7 ± 25.8 mEq/Lであり、4時間後まではほぼ一定に経過し、以後漸減して12時間後には 12.3 ± 7.6 mEq/Lに低下した。しかし、ナトリウム、カリウムいずれの値もばらつきが大きいため、II群とは有意差がなかった。比較的数値の良好な1例を除いての検定では5%の危険率で有意差を認めた。摘出腎の重量の変化は、不変が1例、増加が2例であり、平均の増加率は $7.7 \pm 5.6\%$ であった。良好例のHE染色では、糸球体の構築は良好に維持されており、尿管は胞体の扁平化をわずかに認めるものの、全体の変化は軽微であった。一方、酵素組織化学染色のうちのA1-P染色では、その染色性は極めて不良で、尿管の胞体内に淡く染まるのみで、細胞膜の維持機構の破綻が示された。

【0051】VI群

6例の初期流量は 2.88 ± 0.88 ml/min/g腎とII～V群に比べて非常に多かったが($P < 0.01$)、これ

は、24時間の浸漬保存中に腎が脱水により軽くなったため、計算上、流量が多くなったものである。従って、腎1個当たりの流量は、26~28ml/minであり、他の群とほぼ同じであった。また、終了時の流量は、逆に腎の重量が増加したために、 1.23 ± 0.20 ml/min/腎と低流量になったが、腎1個当たりの流量は、初期の1個当たりの流量と変わらなかった。灌流液のpHは、7.28~7.42 ΔpHの間で変動し、他の群と差は認められなかった。灌流液の酸素分圧は、400 mmHgを下回することはなかった。また、炭酸ガス分圧も2.6~6.8 mmHgと低い分圧で経過した。本群では、II~V群に比して尿量が多く、この傾向は全経過を通じて認められた ($P < 0.05$)。尿pHは、 7.01 ± 0.10 ΔpHで、以後経時的に上昇し、12時間目には 7.21 ± 0.03 ΔpHであった。いずれもII群に比して有意に高値であった ($P < 0.01$)。尿中ナトリウム値は、最初の2時間で 117.7 ± 20.2 mEq/Lを示し、以後経時的に増加した。II群に比して有意 ($P < 0.01$) に高値であった。尿中カリウム値は、ナトリウム値と同様に、2時間値を最高値に経時的に低下した。II群に比して有意 ($P < 0.01$) に低値であった。摘出腎の重量変化は、極めて特徴的で6例全例が大幅に増加した。その増加率は、冷却保存前と常温灌流後間で $+61.6 \pm 36.1\%$ であり、冷却保存後の灌流直前と灌流後間で、 $154.7 \pm 110.4\%$ であった。これは24時間の冷却保存中に発現した脱水による重量減と、灌流中に出現する輸出入血管の著明な浮腫による重量の増加であった。HE染色では、糸球体は正常であり、一部に尿細管胞体の扁平化を認めるものの、全体としての構築は良く保たれていた。本群で特徴的なのは、輸出入血管の著明な浮腫状変化であり、これが灌流終了後の腎重量増加の重要な原因と考えられた。一方、酵素組織化学染色のA1-P染色では、II群に比して劣るものの、IV群とほぼ同等の染色性が保たれていた。

【0052】以上のI~VI群の実験結果から、以下のことがわかった。安定した酸素供給と基質の供給のため

に、80 mmHgの灌流圧としたところ、12時間あるいはそれ以上の長時間保存の可能性が示された。利尿の程度、尿の色調、尿pH、尿中ナトリウム、カリウム値の簡便かつ迅速な検査法により、保存された腎のviability判定が可能であった。温阻血群の結果 (尿pH、尿中ナトリウム、カリウム値の変動が4~6時間で最も良好な値を示した) から、本方法による障害腎のconditioningが可能であることが示唆され、家兎腎の温阻血限界は40分前後と考えられた。

10 【0053】実験例2

実施例1の灌流液を用い、以下に示す実験を行った。実験動物は、体重15~20 kgの雄ブタ ($n=5$) を用いた。麻酔および灌流液の酸素化は、実験例1に準じて行った。全麻下に開腹した後、門脈、肝動脈、肝上部および肝下部大静脈を遮断し、門脈よりチュービングして灌流した。肝下部大静脈にチュービングして灌流液を回収し、閉鎖回路として肝を灌流保存しながら、50%肝切除施行した。計2時間灌流した後、血流を再開した。下大静脈血、門脈血はバイオポンプで外腔静脈に返血した。血流再開30分後に肝生検を行ない、組織学的に検討した。また、実験終了直後、24時間後、48時間後に採血し、肝機能、凝固・線溶系因子の変動を検討した。その結果、全例において長期の生存が得られた。組織学的にはHE染色で肝の構築は保たれており、肝細胞にも異常を認めず、A1-P染色でも肝細胞の機能温存が証明された。T. Bil (血清総ビリルビン値) は0.5 mg/dL以下で推移し、GOTは24時間後に最高値をとり (平均265)、GPTは観察期間中全て40以下であった。凝固・線溶系因子にも異常を認めなかった。以上より、肝切除時における本灌流法の肝保護の有用性が示された。

【図面の簡単な説明】

【図1】灌流回路の構成を示す概略図である。

【符号の説明】

- 2 灌流液
- 10 摘出腎 (臓器)

特開平6-305901